

パン酵母の核酸について

黒 田 温 子*

緒 言

核酸 (Nucleic acid) は核蛋白質 (Nucleoprotein) と共に生命現象に密接な関係を有する物質として最近その研究が大変重要視されて来た。核酸を大別すると Ribonucleic acid (RNA) と Desoxyribonucleic acid (DNA) の二つに分ける事が出来る。核酸は一般に Mononucleic acid が 4 分子結合して Tetranucleotides となりこれが更に蛋白質と結合して核蛋白質を形成していると考えられている。即ち核酸の構造は四個の塩基 (Base) と糖、磷酸とが結合して成り立っていると云える。

RNA と DNA の二つについてその構成成分をみると、RNA は磷酸の他に糖として Pentose (主として Ribose 註1) Base としては Adenine, Guanine, (Purine base), Cytosine, Uracil, (Pyrimidine base) を含み分子量も 10,000~30,000 と云われている。一方 DNA は磷酸の他に糖としては, 2-d-Desoxypentose (主として 2-d-Desoxyribose 註2), Base としては Adenine, Guanine, (Purine base) の四種を含み分子量も 1,000,000 と云われている。

酵母中に含まれている核酸はその大部分が RNA でごく少量の DNA を有するものと考へられている。RNA は広くすべての生活体に存するが酵母が一番多い原料の一つで RNA の代表とされ自然の状態では Monoprotein として原形質中に含まれている。この他に含有するものとしては脾臓、細菌、ウイルス、細胞質顆粒等でこれからも抽出されている。これに反し DNA は古くより仔牛の胸腺に多量含まれている事から胸腺中の核酸をもつて DNA の標準としている。DNA は一般に生物細胞核中のみ存在していて Protamine, Histone と結合して Desoxypentosenucleoprotamines, Desoxypentosenucleohistones となつ

* 昭和32年度本学卒業生 平教授指導

註1 糖が d-Ribose である事が明らかとなつてゐるのは、酵母核酸位とある。

註2 糖が d-2-Desoxyribose である事が明らかとなつてゐるのは胸腺核酸にすぎぬ。

て含有されておりこれらから DNA を単離する事が出来る。

酵母から核酸を抽出するのには細胞膜を破壊し次に蛋白質から核酸と分離する処理を行う事で、方法は色々あるが私は Clarke Schryver 法即ち食塩水で抽出し塩酸による沈降法でもつて実験した。核酸は pH や温度、酵素等に極めて弱くたやすく分解するのでその処理には注意が肝要である。酵母よりの収量は生圧搾酵母に対し 1% 前後で多いものは 2~3% にものぼる。私の実験結果では 0.8% の収量を得た。又核酸は現在医学、生化学の分野に於ける重要な物質でその用途は種々の Purine, Pyrimidine, Nucleotides 及び Nucleosides の原料としてその生理作用は今なお研究中であるが発育の根本的役割をなし、代謝病の治療やめづらしい化学薬品の原料として酵母は有利な給源である。私は次に記す方法で酵母中の核酸の定量を行い、更に核酸を抽出してその構成成分を研究した。

實 験

1 パン酵母中の核酸及び各形態磷の定量 Schneider 法¹⁾

A) 原 理

動植物組織中の磷化合物はその分析的性質から次の四種に分けられる。

- 即ち 1) 酸可溶性物質 (磷酸, Mononucleotides) 糖類その他低分子磷酸エステル等)
- 2) 磷脂質
- 3) 核酸
- 4) 磷蛋白質

である。Schneider 氏は核酸が Trichloroacetic acid (TCA) に冷時には不溶であるが加熱すれば完全に可溶性となる性質を利用して核酸を定量的に抽出し、かつ抽出物中の Ribonucleic-acid, Desoxyribonucleic acid をそれらの糖成分の呈色反応より定量する事に成功した。私はこの原理に基づき本実験を試みた。

B) 抽出操作

材料としてはパン酵母 (生圧搾酵母) 三共株式会

社製の出来得るかぎり新鮮なものを用いた。

1) 酸可溶性化合物の除去

酵母5gを正確に秤取し(10% TCA 50 mlを加え氷冷しつつ十分混和し速に遠心分離し上澄を除き沈澱に再び10% TCA 50 mlを加え均一な懸濁液となし遠心分離する。沈澱は2)に用い上澄は先の上澄と合併して酸可溶性劃分とする。

2) 磷脂質の除去

1)の沈澱に20mlの水を加え95% Alcohol 40mlを追加しよく懸濁し遠心分離する。沈澱は再び95% Alcoholに懸濁しTCAを出来るだけ除去し遠心分離する。次に沈澱をAlcohol: Ether (3:1)の混液 30 mlに懸濁し沸石を入れ冷却管をつけて湯浴中で3分間沸騰せしめ、冷却後遠心分離し上澄を除き得られた沈澱を同様にして3回抽出し3回分の上澄を磷脂質劃分とする。

なお沈澱は次の核酸抽出に用いる。

3) 核酸の抽出

2)の沈澱に10mlの水と10% TCA 30mlを混じよく攪拌した後遠心分離する。次に沈澱を5% TCA 40ml中に再び懸濁し90°Cの湯浴中で15分間加熱後冷却し遠心分離して上澄をとり、再び5% TCA 50 mlを加えよく攪拌して遠心分離する。以上の抽出液を全部合せて核酸抽出劃分とする。

4) 磷蛋白質

3)の沈澱に2% NaOH 40mlを加え沸騰湯浴中で5分間加熱し溶解さす、これを磷蛋白質劃分とする。

C) 定 量

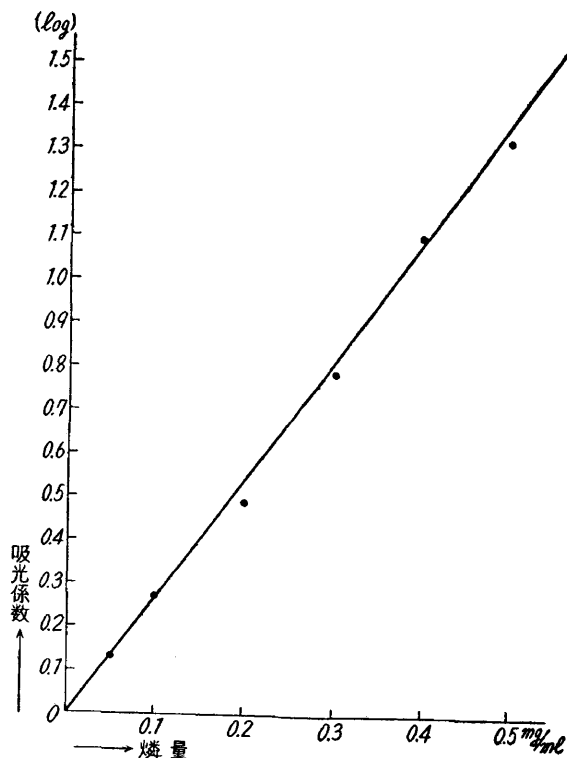
1) 各形態磷の定量 Allen 法²⁾ 注3

1) 酸可溶性化合物

④ 試料; 前記操作による上澄液100 mlを用いた。

⑤ 操作; 2 mlの試料液をMicro Kjeldahl flaskに取り2.2 mlのPerchloric acid(60%)を加え分解し分解後少量の水を加え沸騰湯浴中に10分間放置後2mlのAmidol(2gのAmidolと40gの純重亜硫酸ソーダーを水で溶かして200 mlとする)と1 mlのAmmonium-molybdate 8.3%)及び水で25mlと5~30分間の間にコタキ製光電比色計(Filter S72)]を用い測定した。先に磷酸塩標準溶液(KH_2PO_4)でもつて同様にして標準曲線

第1図 磷の標準曲線



をつくりこれより磷の含有量を求めた。第1図は磷の標準曲線である。

⑤ 結果;

2 ml中の磷量0.123mg
100 ml中(酵母5g中)の磷量.....6.15mg
酵母100g中の磷量.....123mg

2) 磷脂質

④ 試料; 前記操作による上澄90 mlを用いた。

⑤ 操作; 前記1)と同方法により第一図より磷含有量を求めた。

⑥ 結果:

10 ml中の磷含有量.....0.046mg
90ml(酵母5g)中の磷含有量.....0.417mg
酵母100g中の磷含有量.....8.334mg

3) 磷蛋白質

④ 試料; 前記操作による溶液40 mlを試料とした。

⑤ 操作; 前記1)2)と同一方法による。

⑥ 結果;

2 ml中の磷量.....0.11mg
40 ml(酵母5g)中の磷量4.4mg
酵母100g中の磷量88mg

2) 核酸の定量 Kerr 等の方法 3)

1) Ribonucleic acid の定量

④ 試料; 前記操作による抽出液を2倍に稀め

これを試料液とした。

⑥ 操作；試料液 1 ml を試験管にとり 1 ml の FeCl_3 (0.02 % Conc. HCl Solution) 及び 0.06 ml の Orcinol (10% Alcohol Solution) を加え 20 分間沸騰湯浴中で加熱し冷却後 1 ml を加えコタキ製光電比色計 (Filter S61) を用いて同様に比色定量してつくった標準曲線と照らし RNA の量を求めた。第二図が RNA の標準曲線である。

⑦ 結果；中挿法により求めた含有量

1 ml 中の RNA の量……………0.56 mg.

酵母 5g 中の RNA の量……………72.8 mg.

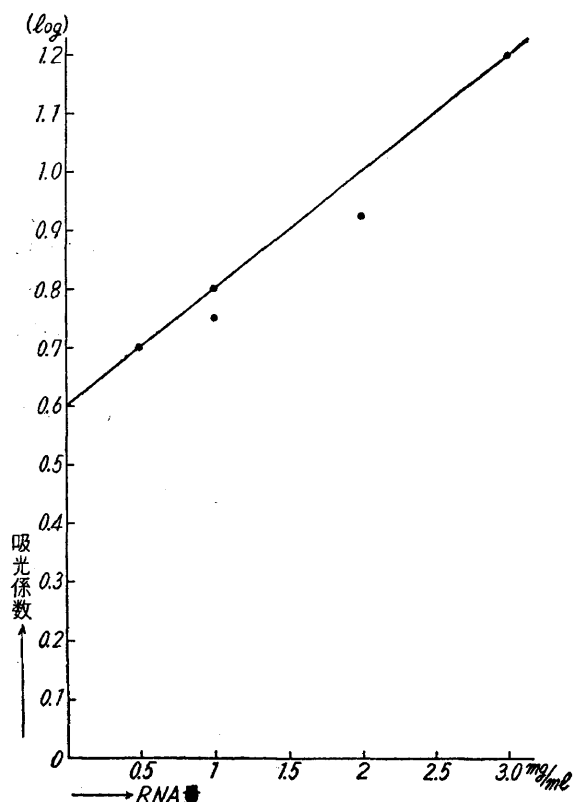
酵母 100g 中の RNA の量……………1456 mg.

2) Desoxyribonucleic acid の定量 Diphenylamin 反応法 4)

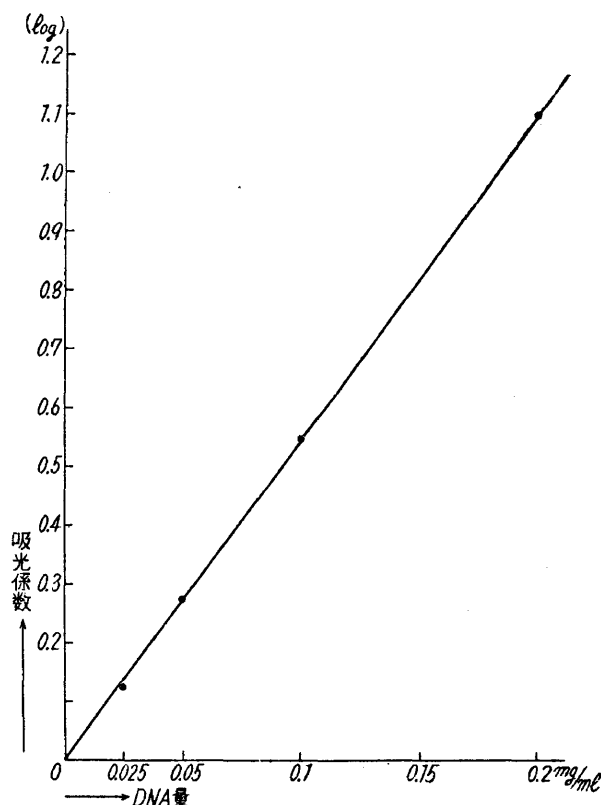
③ 試料；前記操作による核酸抽出液 130 ml をそのまま試料液とした。

⑥ 操作；試料液 1 ml に試薬 (Diphenylamin 1% を含む Acetic acid 溶液 40 ml に対し 1.1 ml の Conc. H_2SO_4 を加えたもの) を加え沸騰湯浴中で正確に 5 分間加熱後冷却し約 10 分後に比色する。(Filter S57) 同様にしてつくった標準曲線より DNA の量を読む。第三図が標準曲線である。

第2図 Ribonucleic Acid の標準曲線



第3図 Desoxyribonucleic acid の標準曲線



⑦ 結果；中挿法より求めた含有量、

1 ml 中の DNA の量……………0.11 mg

酵母 5g 中の DNA の量……………1.43 mg

酵母 100g 中の DNA の量……………28.6 mg

以上の定量結果をまとめると第一表のようになる。

第1表

パン酵母中の核酸及び各形態磷の含有量

核酸及び各形態磷の名称	パン酵母100g中のmg数
Ribonucleic acid	1456.0mg
Desoxyribonucleic acid	28.6mg
酸可溶性化合物	123.0mg
磷脂質	8.3mg
磷蛋白質	88.0mg

2 酵母核酸の抽出 Clarke Schryver法 5)

A) 試料

パン酵母 (生圧搾酵母) 三共株式会社製製品を使用した。

B) 操作

酵母に約 2 倍量の 95% Alcohol を加えてよく混和した後一液放置して濾過し再び同容量の Alcohol とよく混和して 2～3 時間後濾過する。この酵母に Alcohol 2 倍量を加えてよく攪拌し還流冷却管をつけ

湯浴中で2時間煮沸し冷後濾過する。これを空气中に拡げ乾燥さす。この Alcohol 処理により蛋白質は次の食塩抽出液中に移行せぬ様になり脂肪その他の物質が除去される。

乾燥酵母15gを10%食塩水 150 ml 中に懸濁し70~80°C で3日間温浸する。この抽出液を冷却し遠心分離し透明な上澄液に 50% HCl 1.35 ml を加えよく攪拌後沈澱を遠心分離して集める。この沈澱を 95% Alcohol で洗い更に 50% Alcohol で Cl イオン反応がなくなる迄洗い 95% Alcohol に浸し一夜放置後遠心分離して沈澱を集め、最後に無水 Alcohol と Ether で順次 3 回位くり返し洗つて Desiccator 中で乾燥した。

C) 収 量

収量は 1 Pound 生圧搾酵母より 3.6026g を得た。即ち 0.8% である。

得たる核酸は帯灰白色の白色粉末である。

3 酵母核酸の成分研究

A) 窒素の定量 Kjeldahl 法

1) 試 料

前記抽出による核酸 200 mg を正確に採取する。

2) 操 作

核酸を Micro Kjeldahl flask にとり Conc. H_2SO_4 と少量の酸化剤を加え分解し最後に 30% H_2O_2 を加え 10 分位加熱する。分解終了後 Kjeldahl 蒸溜装置を用いて窒素を定量した。

3) 結 果

a) 計 算:

$$\frac{0.0014 \times (20 - 1.6) \times 100}{0.2} = 12.88$$

⑥ 2 の酵母核酸の窒素含有量は 12.88%

b) 燐の定量 Allen 法

1) 試 料

前記抽出による酵母核酸 250 mg を 25 ml の Mess flask で 5% TCA を用いて溶解さす。

(1 ml 中に 10 mg 含有)

2) 操 作

前記各形態の燐の時と同様に比色定量し第一図の標準曲線により燐量を求めた。

3) 結 果

試料溶液 0.5 ml 中の燐量 0.36 mg

核酸 10 mg 中の燐量 0.72 mg

故に 2 の抽出による核酸の燐含有量は 7.2% となる。次に燐、窒素、その比(N/P)を第二表に示す。

第 2 表

核 酸 試 料 の 分 析

	窒 素	燐	N/P
抽出した核酸	12.88%	7.2%	1.78

c) 核酸(Ribose, Desoxyribose) の定性

1) Orcinol 反応による RNA (Ribose) の定性

④ 試料: 1 ml 中に 10 mg 含有する様に 10% TCA で溶解しこれを試料液とした。

⑤ 操作: 前記定量を同様に行つた。

⑥ 結果: Ribose の呈色により少し黄色を帯びた緑色を呈した。これにより RNA の含有を認めた。

2) Diphenylamin 反応による DNA (Desoxyribose) の定性

④ 試料: Orcinol 反応と同一物を使用。

⑤ 操作: 前記定量時と同一方法で行つた。

⑥ 結果: 生じた色は紺色を少し帯びた青色をわずかに認められた。これより DNA の含有を認めた。

d) 蛋白質の一般反応

核酸は蛋白と結合して自然界に存している関係上純度試験として Biuret reaction と Xanthoprotein を試みた。

1) Biuret reaction

核酸をごく少量とり温水で溶解させ 1% 硫酸銅溶液 1.2 滴を加えるとごくわずかに紫色を呈した。

2) Xanthoprotein reaction

核酸溶液 3 ml に Conc. HNO_3 1 ml を加え煮沸すると黄色溶液となつた。

この二つの反応によりごくわずかに乍ら不純物として蛋白質を含んでいる事が認められる。

e) Paper chromatography による有機塩基の検索

1) 試料調製

乾燥核酸 50 mg を Glass bombe (直径 1 cm) 中に取り 6 N-HCl 2 ml を加え封管後 120°C の油浴中で 2 時間加水分解後、HCl を溜去し蒸留水 2 ml を加えこれを Paper chromatography 用試料とした。

2) 操 作

注4 洗滌が完全であるか否かは別の濾紙片に $Hg(NO_3)_2$ を Spray と同じ容器中で同時に洗滌し時々取り出して硫化アンモン溶液につけて黒変するか否かで判定した。

1) 方法

Paper chromatography 一次元上昇法

2) 展開液

n-Butanol satd. H_2O

3) 濾紙

東洋濾紙 No. 50(40cm×3cm)

4) 展開温度

30°C

5) 発色方法

濾紙を風乾後105°Cで20分加熱し0.1Mol. 酢酸第二水銀1容と1 Mol. の酢酸ソーダ3容と水6容を混じ(発色時ごとに混和)30秒浸し、ゆるい水の流れの中につけて完全に洗滌す。^{注4)}洗滌後硫化アンモン溶液中に浸すと硫化水銀の黒い Spot を生じる。これが Purine, Pyrimidine base の位置を示す。

3) 結果

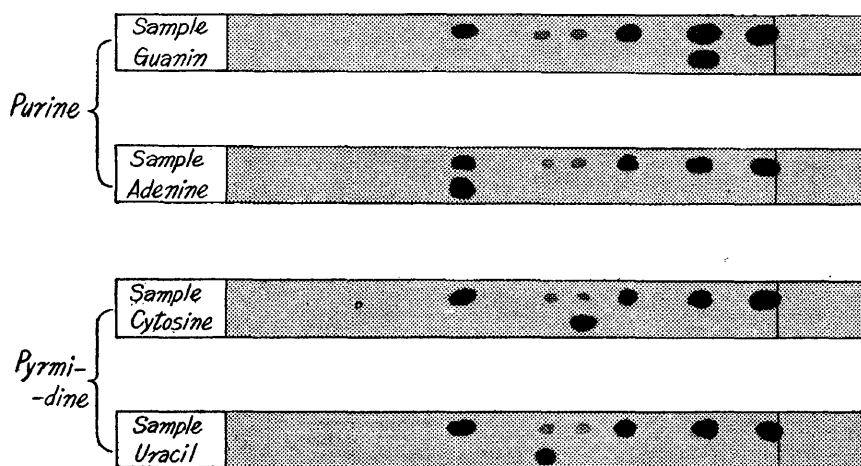
発色処理により黒色の Spot 6 個を検出した。

このうち5個は純品との同時展開により Purine base3 個即ちGuanine, Adenine, Xanthine と Pyrimidine base 2 個即ち Cytosine, Uracil である事を確認した。後1個の Spot はHypoxanthine は他の Base と異り核酸構成成分とは考えられていないが天然にも発見されるし、夫々 Guanine, Adenine, の脱 Amino により生成される purine base と云われている。なお夫々の Rf は第3表の如く、第4図と第5図は縮尺 1/2 のものである。

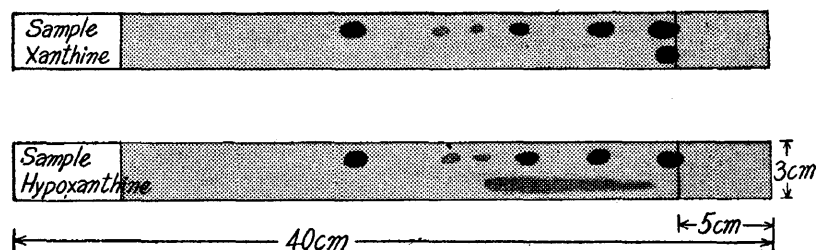
第 3 表

Base	Sample の Rf	Standard の Rf
Guanine	0.08	0.08
Adenine	0.44	0.45
Xanthine	0.02	0.01
Cytosine	0.24	0.24
Uracil	0.34	0.35
Hypoxanthine	0.17	0.17(?)

第4図 核酸構成有機塩基



第5図



総括と考察

1) Schneider 法による酵母核酸の定量結果、酵母 100g中に PNA 1456.0mg と DNA 28.6mg を含む事がわかった。それ故酵母核酸が RNA の標準とされ

るのうなづける。

2) 酵母中の各形態磷の含有量は酸可溶性化合物 123 mg, 磷脂質 8.33mg 磷蛋白質 88.0mg (夫々酵母 100 g中の量) である。

3) パン酵母(生圧搾酵母) 1 Poundより Clarke

Schryver 法により得た酵母核酸の収量は 3.6026g で約0.8%となる。

- 4) この核酸は窒素12.88%, 磷7.2%, その比 N/P 1.78で, Steudel Izumi の同一方法で抽出した分折値と比較してみると窒素が多く磷が少い。これは核酸中の諸成分の量が一定であるとされているので窒素, 磷の分折値もN/P も一定のはずである。しかるに核酸はもとは蛋白質と結合していたものであるからこれを充分に除く事は大変困難で, もしこの蛋白質が完全に除かれていないと窒素が増え磷が少なく N/P も相当高くなる筈である。故に N/P でもつて核酸の純度を一応決める事が出来る。本実験はもう少し精製すると純品に近くなる。

- 5) 蛋白質の一般反応を行つた結果 Biuret reation Xanthoprotein reation共わずか乍ら認められた。これよりも核酸抽出に際し完全に除蛋白されていない事がわかる。

- 6) 酵母核酸の構成成分

A) 有機塩基: Purine base-Guanine, Adennine, Pyrimidine base-Cytosine, Uracil,

B) 糖: Orcinol 反応よりRibose の含有を認めた。

C) 磷酸: 核酸中の磷定量は磷酸量は磷酸量に基づき定量される事より含有は認められる。

故に以上のものを構成成分として含有している。即ち核酸は Base に糖のくついた Nucleosides が構成成分として含まれこれに磷酸が結合したものが Nucleotide で更にこの重合体が核酸と推定される。

以上の結果より最近医学, 生化学の方面に重要な核酸の原料として, 酵母は培養も簡単で増殖率も高いしその給源としては極めて適当と思う。

稿を終るに臨み終始ねんごろに御指導たまわつた平友恒教授並びに, 高橋, 今村両先輩に心より深謝申上げる。

参 考 文 献

- 1) 江上不二夫編: 核酸及び核蛋白質(上) P135.
- 2) 江上不二夫, 石本真, 丸尾文治, 三浦義影, 関根隆光, 須田正己, 田宮信雄編: 標準生化学実験 P 136
- 3) 江上不二夫編: 核酸及び核蛋白質(上) P 143
- 4) 江上不二夫編: 核酸及び核蛋白質(上) P 140
- 5) 標準生化学実験: P 141